

PCT/KR 03 / 02415

RO/KR 19.11.2003



REC'D 02 DEC 2003
WIPO PCT

별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

BEST AVAILABLE COPY

출 원 번 호 : 10-2003-0024776
Application Number

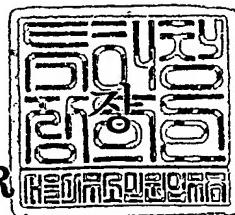
출 원 년 월 일 : 2003년 04월 18일
Date of Application APR 18, 2003

출 원 인 : 학교법인고려중앙학원
Applicant(s) KOREA CHUNGANG EDUCATIONAL FOUNDATION

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2003 년 11 월 08 일



특 허 청

COMMISSIONER

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【참조번호】	0005
【제출일자】	2003.04.18
【국제특허분류】	C12N
【발명의 명칭】	참깨에서 유래된 식물체 종자 특이적 발현 프로모터 및 이를 함유하는 식물체 종자 특이적 발현 벡터 Plant seed-specific expression promoter derived from sesame and seed-specific expression vector comprising the promoter
【발명의 영문명칭】	
【출원인】	
【명칭】	학교법인 고려중앙학원
【출원인코드】	2-1995-276862-2
【대리인】	
【성명】	이영필
【대리인코드】	9-1998-000334-6
【포괄위임등록번호】	2002-018861-4
【대리인】	
【성명】	이해영
【대리인코드】	9-1999-000227-4
【포괄위임등록번호】	2002-018862-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	서미정
【성명의 영문표기】	SUH,Mi Chung
【주민등록번호】	650409-2017619
【우편번호】	143-761
【주소】	서울특별시 광진구 구의3동 현대프라임아파트 13동 1101호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김미정
【성명의 영문표기】	KIM,Mi Jung
【주민등록번호】	731030-2841912

【우편번호】 134-031
 【주소】 서울특별시 강동구 성내1동 467-7
 【국적】 KR
【발명자】
 【성명의 국문표기】 정정한
 【성명의 영문표기】 CHUNG, Chung Han
 【주민등록번호】 480229-1018414
 【우편번호】 604-081
 【주소】 부산광역시 사하구 괴정1동 1065번지 괴정 자유3차아파트 111호
 【국적】 KR
【발명자】
 【성명의 국문표기】 피재호
 【성명의 영문표기】 PYEE, Jae Ho
 【주민등록번호】 600229-1720922
 【우편번호】 435-040
 【주소】 경기도 군포시 산본동 옥련아파트 1241동 805호
 【국적】 KR
【발명자】
 【성명의 국문표기】 형남인
 【성명의 영문표기】 HYUNG, Nam In
 【주민등록번호】 620718-1025412
 【우편번호】 330-090
 【주소】 충청남도 천안시 쌍용동 현대아파트 101동 103호
 【국적】 KR
【우선권주장】
 【출원국명】 KR
 【출원종류】 특허
 【출원번호】 10-2002-0069589
 【출원일자】 2002.11.11
 【증명서류】 첨부
 【심사청구】 청구
 【핵산영기 및 아미노산 서열목록】
 【서열개수】 3

【서열목록의 전자파일】

첨부

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사 를 청구합니다. 대리인
이영필 (인) 대리인
이해영 (인)

【수수료】

【기본출원료】	20	면	29,000 원
【가산출원료】	20	면	20,000 원
【우선권주장료】	1	건	26,000 원
【심사청구료】	11	항	461,000 원
【합계】		536,000 원	
【감면사유】		학교	
【감면후 수수료】		281,000 원	
【첨부서류】		1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 우선권증명서류 및 동 번역문_1통	

【요약서】**【요약】**

본 발명은 참깨의 마이크로솜 올레산 불포화제(microsomal oleic acid desaturase) (*Si-FAD2*) 계놈 유전자에서 유래된 식물체 종자 특이적 발현 프로모터의 활성 단편, 발현 증가 활성의 인트론(intron) 부위, 이 활성 단편 및/또는 인트론 부위를 포함하는 식물체 종자 특이적 발현 프로모터, 이 프로모터를 함유하는 식물체 종자 특이적 발현 벡터 및 이 종자 특이적 발현 벡터로 형질전환된 식물체를 제공한다.

본 발명은 외래 유전자를 형질전환 식물체에서 발현시키는 방법에 관한 것으로써, 본 발명은 식물체의 종자 특이적으로 유용물질을 생산하거나, 기존의 종자 내 생산 물질을 기능적으로 변형시키고자 하는 형질전환 식물체 개발에 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 본 발명은 발현증가활성의 인트론 부위를 프로모터와 함께 사용함으로써, 도입된 유전자의 발현을 종자에서 적어도 40배 이상 증가시킬 수 있으므로, 본 발명은 식물체의 종자에서 외래 도입 유전자를 대량 발현시키고자 하는 형질전환 식물체 개발에 이용될 수 있다.

【대표도】

도 4a

【명세서】

【발명의 명칭】

참깨에서 유래된 식물체 종자 특이적 발현 프로모터 및 이를 함유하는 식물체 종자 특이적
발현 벡터{Plant seed-specific expression promoter derived from sesame and seed-specific
expression vector comprising the promoter}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 본 발명의 참깨 유래 마이크로좀 올레산 불포화제(microsomal oleic acid desaturase), *Si-FAD2* 유전자의 염기서열(서열번호 1)과 이로부터 연역된 아미노산 서열(서열 번호 2)을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 *Si-FAD2* 게놈 유전자를 모식화하여 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 *Si-FAD2* 게놈 유전자의 프로모터 부위의 염기서열(서열번호 3)을 나타낸 것이다.

도 4a는 본 발명의 *Si-FAD2* 게놈 유전자의 프로모터 영역을 GUS 유전자가 함유된 pBI101에 삽입하여 제조된 본 발명의 바이너리(binary) 벡터 (pBin*SiFAD2*-GUS)를 나타내는 모식도이다.

도 4b는 본 발명의 *Si-FAD2* 유전자의 프로모터가 함유된 바이너리 벡터(pBin*SiFAD2*-GUS) 혹은 CaMV35S 프로모터가 함유된 바이너리 벡터 (pBI121)로 형질전환된 *Agrobacterium*를 바이너리 벡터내에 존재하는 유전자 특이적 프라이머(primer)를 이용하여 PCR을 수행한 결과를 나타낸 것이다.

도 4c는 본 발명의 pBinSiFAD2-GUS 혹은 pBI121으로 형질전환된 *Agrobacterium*를 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) 식물체의 꽃 조직에 접종함으로써 형질전환된 애기장대를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명의 pBinSiFAD2-GUS를 가진 *Agrobacterium*를 이용하여 애기장대를 형질전환 시킨 다음, 형질전환 식물체의 각 조직별 GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법으로 조사한 것이다.

도 6a은 본 발명의 pBinSiFAD2-GUS를 가진 *Agrobacterium*에 의해 형질전환된 애기장대의 각 조직별 GUS 활성을 상대적인 효소 활성도(%)로 나타낸 것이다.

도 6b는 본 발명의 pBinSiFAD2-GUS 혹은 pBI121을 가진 *Agrobacterium*에 의해 형질전환된 애기장대들의 종자 발달 단계별 GUS 활성을 상대적인 효소 활성도(%)로 나타낸 것이다.

도 7a는 본 발명의 Si-FAD2 유전자의 프로모터 영역을 GUS 유전자가 함유된 pBI221에 삽입하여 제조된 본 발명의 트랜зи트(transient) 발현 벡터 (pSiFAD2-GUS)를 나타내는 모식도이다.

도 7b는 본발명의 pSiFAD2-GUS를 참깨의 발달하는 종자에 입자 폭격(particle bombardment) 방법에 의거하여 도입한 다음, 종자에서 GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법으로 조사한 것이다.

도 8a는 본 발명의 Si-FAD2 게놈 유전자의 프로모터와 그의 유전자 안에 존재하는 인트론(intron) 영역을 GUS 유전자가 함유된 pBI101에 삽입하여 제조된 본 발명의 바이너리 (binary) 벡터 (pSiW6-P2.4)와 본 발명의 Si-FAD2 게놈 유전자의 프로모터 또는 그 일부를 GUS

유전자가 함유된 pBI101에 삽입하여 제조된 본 발명의 바이너리(binary) 벡터들 (pSiW6-F1, pSiW6-F2, pSiW6-F3, pSiW6-F4, pSiW6-F5)를 나타내는 모식도이다.

도 8b는 도 8a의 본 발명의 6종류 바이너리 벡터들 (pSiW6-P2.4, pSiW6-F1, pSiW6-F2, pSiW6-F3, pSiW6-F4, pSiW6-F5)을 제한효소 *Hind*III 와 *Bam*HI를 이용하여 절단한 다음, 전기영동한 사진이다.

도 9는 도 8a의 본 발명의 6종류 바이너리 벡터들 (pSiW6-P2.4, pSiW6-F1, pSiW6-F2, pSiW6-F3, pSiW6-F4, pSiW6-F5)과 pBI121 바이너리 벡터를 가진 *Agrobacterium*에 의해 형질전환된 애기장대들을 보여주는 사진들이다.

도 10은 도 9의 7 종류의 형질전환된 애기장대들의 발달 종자, 종자를 둘러싼 꼬투리, 그리고 종자로부터 나온 어린 식물체에서 GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법으로 조사한 것이다.

도 11a는 도 9의 7 종류의 형질전환된 애기장대의 발달 종자 및 종자를 둘러싼 꼬투리에서 GUS 효소의 활성(nmol/hr/mg protein)을 조사한 것이다.

도 11b는 도 9의 7종류의 형질전환된 애기장대로부터 수확된 종자를 항생제 (kanamycin, 30 μ g/ml)가 함유된 배지에서 형질전환체를 선별한 다음, 발아 후 7일째 되는 유식물의 자엽에서 GUS효소의 활성(nmol/hr/mg protein)을 조사한 것이다.

도 12는 본 발명의 *Si*-FAD2 게놈유전자의 프로모터에서 종자특이적발현을 나타내는 프로모터활성단편의 염기서열(서열번호 3의-179 내지-53)을 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- 9> 본 출원은 대한민국 특허청에 2002년 11월 11일자로 출원된 선 특허출원 (출원번호: 10-2002-0069589)을 우선권 기초로 하는 국내우선권주장 출원이다
- 0> 본 발명은 참깨의 마이크로좀 올레산불포화제(microsomal oleic acid desaturase) (*Sis-FAD2*) 게놈유전자에서 유래된 식물체종자 특이적 발현프로모터의 활성단편, 발현증가활성의 인트론(intron)부위, 이 활성단편 및/또는 인트론부위를 포함하는 식물체종자 특이적 발현프로모터, 이 프로모터를 함유하는 식물체 종자 특이적 발현 벡터 및 이 종자 특이적 발현 벡터로 형질전환된 식물체에 관한 것이다.
- 1> 식물체내의 지방산들은 세포막과 종자 내 저장 오일을 이루는 중요한 구성 성분이다. 특히 마이크로좀 올레산 불포화제는 세포 내 소포체 (endoplasmic reticulum) 막에 존재하여 포스파티딜콜린(phosphatidylcholine)의 *sn*-1 과 *sn*-2 위치에 존재하는 일중 불포화지방산, 올레산(oleic acid)를 이중 불포화 지방산, 리놀레산(linoleic acid)로 전환되는 반응을 촉매하는 효소이다.
- > *Arabidopsis*, 폐츄니아, 그리고 면화에서 마이크로좀 올레산 불포화제 게놈 유전자가 보고되었으며, *Arabidopsis*는 게놈 상에 이 유전자가 1개, 그 외의 다른 식물체에는 2개 이상의 유전자가 존재하는 것으로 알려져 있다 (Okuley et al., 1994, Plant Cell; Verwoert et al., 2000, Biochemistry Society Transactions; Pirtie et al., 2001, Biochimica et Biophysica Acta). 특히, 이 유전자가 2개 이상 존재할 경우, 적어도 한 개의 유전자는 종자 오일에 존재

하는 리놀레산(linoleic acid) 생산에 관여하는 것으로 알려졌다. 현재까지 상기 3종류의 식물체로부터 마이크로좀 올레산 불포화제 게놈 유전자가 보고되었으나, 그의 프로모터에 대한 연구는 전 세계적으로 전혀 이루어지지 않았다.

- 3> 최근에 유전 공학 기술을 이용하여 식물의 형질을 개량시키고자 하는 많은 연구가 진행되고 있다. 이러한 과정에서 외래의 유용 유전자를 형질전환 식물체에서 발현시키고자 할 때 유전자 발현에 관여하는 프로모터가 요구된다. 이를 위해 종래에는 식물체의 전 조직에서 발현이 유도되는 꽃양배추 모자이크 바이러스 (cauliflower mosaic virus; CaMV35S) 유전자 유래의 프로모터가 널리 사용되어졌다. 그러나, 이 프로모터는 종자의 특정 조직에만 발현을 조절할 수 없는 단점이 있다. 또한 종자 (Plant Cell Technology, 1991, 3: 568-576), 잎과 꽃 (Science, 1990, 250: 931-936), 꽈경 (Plant Cell Technology, 1991, 3: 577-587) 등의 조직 특이적 발현을 유도하는 프로모터가 보고되어 졌다. 그러나, 상기 종자 특이적 발현 프로모터도 그 발현 시기가 종자의 전 발달 단계에 주로 발현되는 것으로써 이는 종자의 특정 발달 시기에만 특이적으로 발현을 조절할 수 없는 단점이 있다.
- 4> 이에 본 발명자들은 참깨로부터 유래된 마이크로좀 올레산 불포화제가 종자 발달 단계 특이적으로 발현되는 것에 착안하여 그의 게놈유전자 및 프로모터를 클로닝한 후, 프로모터를 바이너리(binary) 벡터 및 트랜зи트(transient) 발현벡터에 삽입하여 모델 식물체인 *Arabidopsis* 및 참깨 종자에 도입한 결과, 참깨 유래 마이크로좀 올레산 불포화제 게놈유전자의 프로모터는 외래 도입 유전자를 종자 발달 단계 특이적으로 발현시키는 신규프로모터임을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.
- 25> 또한, 본 발명자들은 선 특허출원된 종자 특이적 발현프로모터에서 종자 특

이적 발현을 나타내기 위해 필수적인 프로모터 활성 단편에 해당하는 127 bp를 발견하였으며, 참깨 유래 *Si-FAD2* 게놈 유전자에 존재하는 intron을 자신의 프로모터와 함께 사용하였을 때, 종자에서 도입된 유전자의 발현을 적어도 40배 이상 증가시킬 수 있는 사실을 밝힘으로써, intron의 사용에 의하여 외래 유용 유전자를 대량 발현시킬 수 있는 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- 26> 따라서, 본 발명의 목적은 참깨의 마이크로좀 올레산 불포화제(microsomal oleic acid desaturase) (*Si-FAD2*) 게놈 유전자에서 유래된 식물체의 종자 특이적 프로모터에서 종자 특이적 발현을 나타내는데 필수적인 프로모터 활성 단편(127 bp)의 염기서열을 제공하는 것이다.
- 27> 본 발명의 다른 목적은 식물체의 종자 발달 단계 특이적으로 발현되는 프로모터 하에 도입된 외래 유전자의 발현을 증가시킬 수 있는 인트론(intron)의 염기서열을 제공하는 것이다.
- 28> 본 발명의 다른 목적은 참깨의 *Si-FAD2* 게놈유전자에서 유래된 식물체의 종자 특이적, 특히 종자발달 단계 특이적으로 발현되는 프로모터를 제공하는 것이다.
- 29> 본 발명의 다른 목적은 위의 식물체 종자 특이적 발현 프로모터를 함유하는 식물체 종자 특이적 발현 벡터 및 이 종자 특이적 발현 벡터로 형질전환된 식물체를 제공하는 것이다.
- 30> 본 발명의 또 다른 목적은 식물체의 종자발달단계 특이적으로 유용물질을 생산하거나, 기존의 종자 내 생산물질을 기능적으로 변형시키고자 하는 경우, 위의 프로모터를 이용하여 외래 유전자를 형질전환 식물체에서 발현시키는 방법을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- 31> 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 3의 -179 내지 -53의 활성 단편을 포함하는 식물체의 종자 특이적 발현 프로모터를 제공하며, 바람직하게는 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 식물체의 종자 특이적 발현 프로모터를 제공한다.
- 32> 상기 서열번호 3의 염기서열은 본 발명에서 처음 클로닝되고 염기서열분석된 종자 특이적으로 발현되는 참깨의 마이크로좀 올레산 불포화제(microsomal oleic acid desaturase) (*Si-FAD2*) 게놈 유전자의 전사 개시 부위로부터 -660 내지 -1 부위의 염기서열에 해당된다. 따라서, 이 서열은 식물체 유전자의 전사 개시 부위 인식을 위한 프로모터의 공통서열인 TATA와 CAAT box를 함유하며 또한 종자 특이적 전사 활성을 조절하는 부위를 포함할 것으로 기대된다. 또한, 서열번호 3의 -179 내지 -53은 본 발명의 식물체의 종자 특이적 프로모터에서 종자 특이적 발현을 나타내는데 필수적인, 즉 결실되면 활성이 현저히 상실되는 프로모터 활성 단편(127bp)의 염기서열에 해당한다.
- 33> 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 식물체의 종자 특이적 발현 프로모터를 함유하는 식물체의 종자 특이적 발현 벡터를 제공한다.
- 34> 바람직하게는, 본 발명의 식물체종자 특이적발현벡터는 본 발명의 *Si-FAD2* 게놈 유전자의 인트론, 즉 서열번호 1의 149 내지 1722의 발현증가활성 인트론을 포함하는 것을 특징으로 한다. 상기 발현증가활성 인트론이 자신의 프로모터와 함께 사용하였을 때, 종자에서 도입된 외래 유전자의 발현을 적어도 40배 이상 증가시킬 수 있다.
- 35> 바람직하게는, 본 발명의 식물체 종자 특이적 발현 벡터는 상기 프로모터가 바이너리(binary) 벡터의 외래 유전자 앞에 삽입된 것을 특징으로 한다. 본 발명에 이용될 수 있는 바

이너리 벡터는 *A. tumefaciens*의 Ti 플라스미드와 함께 존재시 식물체를 형질전환시킬 수 있는 T-DNA의 BR과 BL을 함유하는 어떤 바이너리 벡터도 될 수 있으므로, 예컨대, pGA 계열, pCG 계열, pCIT 계열, pGPTV 계열, pBECK2000 계열, BiBAC 계열, 및 pGreen 계열 벡터 등을 사용할 수 있으나, 바람직하게는 당업계에서 용이하게 입수가능한 pBI101 (Clontech, 미국)를 사용하는 것이 좋다. 또한, 본 발명에 사용될 수 있는 외래 유전자는 해당 식물체에 발현되길 원하는 외부 유래의 어떤 표적 유전자 또는 리포터 유전자도 포함한다.

- 36> 상기 본 발명의 식물체 종자 특이적 발현 벡터에서, 본 발명의 프로모터는 바이너리 벡터에 함유된 외래 유전자와 전사(transcription) 작동가능하게 결합되어 있으며, 본 발명에서 그 한 예로서 리포터 유전자인 GUS 유전자가 함유된 pBI101에 본 발명의 프로모터를 삽입하여 바이너리 벡터 (pBinSiFAD2-GUS)(도 4a)를 제작하였으며, 이를 이용하여 *Arabidopsis*를 형질전환시켰다(실시예 4 참조).
- 37> 또한, 본 발명의 식물체종자 특이적발현벡터에서, 본 발명의 프로모터와 인트론은 바이너리벡터에 함유된 외래유전자와 전사(transcription) 작동가능하게 결합되어 있으며, 본 발명에서는 그 한 예로서 리포터유전자인 GUS유전자가 함유된 pBI101에 본 발명의 프로모터 및 인트론을 삽입하여 바이너리 벡터(pSiW6-P2.4)(도 8a)를 제작하였으며, 이를 이용하여 *Arabidopsis*를 형질전환시켰다(실시예 8 참조).
- 38> 바람직하게는, 본 발명의 식물체종자 특이적발현벡터는 상기 프로모터가 트랜전트 (transient)발현벡터의 외래유전자 앞에 삽입된 것을 특징으로 한다. 본 발명에 이용될 수 있는 트랜전트 발현 벡터는 외래유전자를 도입된 식물체내에서 일시적으로 발현될수 있도록 제작된 어떤 트랜전트발현벡터도 될수 있으므로, 예컨대, pBI221(Mitsuhara et al., 1996), pMG221(Maas et al., 1991), pUbiGUS(Christensen and Quail, 1996), 및 ACT1-D(McElroy et

al., 1990) 등을 사용할 수 있으나, 바람직하게는 당업계에서 용이하게 입수가능한 pBI221 (Clonetech, 미국)을 사용하는 것이 좋다. 또한, 본 발명에 사용될 수 있는 외래 유전자는 해당 식물체에서 발현되길 원하는 외부 유래의 어떤 표적 유전자 또는 리포터 유전자도 포함한다.

- 39> 상기 본 발명의 식물체 종자 특이적 발현 벡터에서, 본 발명의 프로모터는 트랜전트 발현 벡터에 함유된 외래 유전자와 전사(transcription) 작동가능하게 결합되어 있으며, 본 발명에서는 그 한 예로서 리포터 유전자인 GUS 유전자가 함유된 pBI221에 본 발명의 프로모터를 삽입하여 트랜전트 발현 벡터(pSIFAD2-GUS)(도 7a)를 제작하였으며, 이를 이용하여 참깨 종자를 형질전환시켰다(실시예 5 참조).
- 40> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 상기 본 발명의 식물체 종자 특이적 발현 벡터로 형질전환된 식물세포 또는 식물체를 제공한다.
- 41> 상기 식물체종자 특이적발현벡터가 바이너리벡터인 경우에는 Floral dip방법 (Clough 와 Bent, 1998, The Plant Journa)에 따라 식물체를 형질전환시키고, 트랜전트발현벡터인 경우에는 Particle bombardment 방법(Lacorte et al., 1997, Plant Cell Reports)에 따라 식물체를 형질전환시킬 수 있다. 본 발명의 식물체 종자 특이적발현벡터는 쌍자엽 혹은 단자엽 식물, 유성생식 혹은 무성생식 식물에 상관없이 어떤 식물체도 형질전환 시킬수 있으나, 본 발명에서는 그 예로서 *Arabidopsis* 와 참깨(*Sesame indicum* cv.)의 형질전환만을 실시하였다(실시예 4, 5 참조).
- 2> 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 본 발명의 식물체 종자 특이적 발현 벡터를 이용하여 외래 유전자를 형질전환 식물체에서 발현시키는 방법을 제공한다.

- 3> 상기 외래 유전자는 식물체에서 발현을 원하는 어떤 유전자도 될 수 있으며, 본 발명의 식물체 종자 특이적 발현 벡터에서 상기 프로모터 또는 인트론의 뒤에 위치하며 필요에 따라 리포터 유전자와 융합되어 발현될 수도 있다.
- 4> 본 발명은 식물체 종자 특이적으로 발현이 유도되는 마이크로좀 올레산 불포화제 (microsomal oleic acid desaturase) 게놈 유전자의 종자 특이적 프로모터 및 이 프로모터를 사용하여 외래 유전자를 형질전환 식물체에서 발현시키는 방법에 관한 것으로써, 본 발명은 마이크로좀 올레산 불포화제 게놈 유전자의 프로모터와 형질전환 식물체 제조 방법을 이용하여 식물체의 종자 발달 단계 특이적으로 유용물질을 생산하거나, 기존의 종자 내 생산 물질을 기능적으로 변형시키고자 하는 형질전환 식물체 개발에 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 본 발명은 발현증가활성의 인트론 부위를 프로모터와 함께 사용함으로써, 도입된 유전자의 발현을 종자에서 적어도 40배 이상 증가시킬 수 있으므로, 본 발명은 식물체의 종자에서 외래 도입 유전자를 대량 발현시키고자 하는 형질전환 식물체 개발에 이용될 수 있다.
- 45> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이를 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이를 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.
- 46> (실시예 1) 참깨에서 유래된 microsomal oleic acid desaturase (*Si-FAD2*) 게놈 유전자의 클로닝 및 염기서열 분석
- 47> 참깨의 종자 특이적 *Si-FAD2* 유전자의 게놈(genomic) 클론을 확보하기 위하여 참깨(*Sesame indicum* cv. 양백)의 어린잎으로부터 genomic DNA를 추출(Dellaporta et al., 1984, in Molecular Biology of Plants)하였다. Jin et al. (2001, Plant Science)에 의해 보고된 cDNA 염기서열에 근거해서 Forward primer W6-1 (5'-GACAAAATGGGAGCCGGAGGACGCATGT-3')과 Reverse

primer W6-R1 (5'-CGGCTTCAGAACTTGTCTTGTACCAGA-3')를 제작한 후 중합효소 연쇄 반응 (Polymerase Chain Reaction, 이하 'PCR'로 약칭함) 방법을 이용하여 참깨 FAD2 (microsomal oleic acid desaturase) 유전자에 대한 게놈 클론을 분리하였다. 분리된 게놈 클론은 pGEM-T 벡터(Promega, 미국)에 클로닝한 후, ABI Bigdye cycle sequencing kit (PE Applied Biosystems, 미국)을 이용하여 염기서열을 분석하였다. 보고되어진 cDNA (GenBank Accession No: AF192486)와 비교하였을 때, cDNA의 5' 말단에 존재하는 9 bases (CGGCACGAG)를 제외한 전 염기서열이 동일한 클론임이 확인되었다. *Si*-FAD2 유전자의 genomic 클론은 coding region에는 intron이 존재하지 않았으며, 5' untranslated region 내에 1574 base에 해당하는 1개의 큰 intron이 존재하였다. *Si*-FAD2 유전자의 염기서열(서열번호 1)과 이로부터 연역된 아미노산 서열(서열번호 2)을 도면 1에 나타내었다. 붉은 색 글씨의 첫 번째 염기 A는 전사 개시 부위를 나타내며, 이탈릭체로 나타낸 부분(GT-AG)은 5'untranslated region 내에 존재하는 intron 부분에 해당한다.

- 48> (실시예 2) *Si*-FAD2 유전자의 5' upstream region 확보 및 염기서열 분석
- 49> 참깨의 종자특이적 *Si*-FAD2 프로모터 부위를 클로닝하기 위하여 *Si*-FAD2 genomic 유전자 의 염기서열과 Nde I 제한효소 부위를 이용하여 inverse PCR을 수행하였다. Inverse PCR은 보통 프로모터와 같은 미지의 영역을 탐색하는데 있어서 많이 사용되어지고 있다(Digeon et. al., 1999, Plant Molecular Biology). Inverse PCR을 수행하기 위해 genomic DNA를 Nde I 제한효소로 완전히 절단한 뒤, T4 DNA Ligase (BM, 독일)를 이용하여 self ligation을 시켜 이것을 template로 사용하였다. Inverse PCR은 specific한 PCR 산물을 얻기 위해 2단계로 진행이 되는데, 우선 1st PCR을 유전자 특이적 primers (W6-1; 5'-GACAAAATGGGAGCCGGAGGACGCATGT-3' 과 W6-R6; 5'-GGGGCACGTTACCTGAAACTTGGAAAG-3')를 사용해 얻어진 PCR 산물을 다시 얀쪽 primers

(W6-2; 5'-GGCTTGGGACGAAGACTTCGTACGCT-3', W6-R7; 5'-CGCGTGAAAGCACTTCTGCGGAAGCGC-3')를 이용해서 2nd PCR을 실시했다. 그 결과 약 750 bases에 해당하는 *Si-FAD2* genomic 유전자의 5' upstream region(-660 내지 +90)을 확보하였다. 도 2a는 본 발명의 참깨 유래 microsomal oleic acid desaturase, *Si-FAD2* 게놈 유전자를 모식화하여 나타낸 것으로서, SiW6F1, SiW6R1, W6R3, W6R5, 그리고 W6R1은 아래 도2(B)에서 사용될 primers의 위치를 나타낸 것이다.

- 50> 확보된 부위가 정확히 *Si-FAD2* genomic 유전자의 5' upstream region인지를 확인하기 위하여 750 bases의 5' 말단 및 *Si-FAD2* genomic 유전자의 염기서열에 근거하여 유전자 특이적인 primers(SiW6F1, SiW6R1, W6R1, W6R3 및 W6R5)를 제작하여 PCR을 수행한 결과, 정확히 약 750 bases에 해당하는 부위가 *Si-FAD2* genomic 유전자의 5' upstream 부위임을 확인하였다. 도 2b 는 참깨의 잎으로부터 genomic DNA를 분리하여 도 2a에서 보여지는 primers를 이용하여 PCR을 수행한 결과를 나타낸 것이고, M1, M2는 DNA size 마커이고; 제 1열은 SiW6F1 (5'-CCGAAGCTTCATATGTGAAATGTAATGGAAAATGCGAC3')과 SiW6R1 (5'-CTTGGATCCTTGGAAAGGAGAAATCGCGTGAAAGCAC-3')을 사용하여 얻은 PCR 산물이고; 제 2열은 SiW6F1과 W6R1 (5'-CGGCTTCAGAACCTTGTCTTGTACCAGA-3')을 사용하여 얻은 PCR 산물이고; 제 3열은 SiW6F1과 W6R5 (5'-GGAGAACGAAACGGCTGACGGATCTCTCG-3')를 사용하여 얻은 PCR 산물이고; 제 4열은 SiW6F1과 W6R3 (5'-GGCTTGGG ACGAACGACTTCGTACGCT-3')를 사용하여 얻은 PCR 산물이다. 상기 *Si-FAD2* genomic 유전자의 5' upstream region 부위의 염기서열을 분석한 후, 그중 전사 개시 부위로부터 -1 내지 -660인 프로모터 부위의 염기서열(서열번호 3)을 도면 3에 나타내었다.
- 51> (실시예 3) *Si-FAD2* 유전자의 전사개시 부위 확인

- 52> 참깨의 종자특이적 *Si-FAD2* 유전자의 프로모터 부위의 활성을 조사하기 위해서는 이 유전자의 정확한 전사개시 부위가 확인되어야 하므로 cRACE (circular first-strand cDNA-mediated rapid amplification of cDNA ends) 방법 (Maruyama et al., 1995, Nucleic Acid Research)에 의거하여 *Si-FAD2* 유전자의 전사개시 부위를 확인하는 연구가 수행되었다. 수행 과정을 보면 우선 참깨의 종자로부터 전체 RNA를 분리한 후, T4 polynucleotide kinase(TAKARA)에 의해 인산화된 gene specific primer (GGTAGCAGTATGGGGATGGCAGCAGATGGAAGTA) 와 역전사 효소 (reverse transcriptase, BM)를 이용하여 cDNA를 합성한 다음, T4 RNA ligase (NEB)를 이용하여 5' 말단과 3' 말단을 연결한다. 이를 주형으로 유전자 특이적 primers (W6-5 ; 5'-GAAGAACCCCTCCAACGGGTGCC-3'와 W6-R9; 5'- CCGATCACATCGCAAGTGCGATAACCTG-3')를 이용하여 PCR을 수행한 결과, 도면1에서 첫 번째 염기(붉은 색) "A"가 전사 개시 (transcription initiation)부위로 확인되었다.
- 53> (실시예 4) *Arabidopsis* 형질전환에 의한 *Si-FAD2* 유전자 프로모터의 활성 분석
- 54> *Si-FAD2* 유전자 프로모터의 발현 양상을 분석하기 위하여 클로닝된 *Si-FAD2* 유전자의 프로모터 및 GUS reporter 유전자를 함유하는 binary 벡터 (pBin*SiFAD2*-GUS)를 제조하였다. 우선 참깨의 게놈 DNA를 주형으로 SiW6F1 (5'-CCGAAGCTTCATATGTGAAATGTAATGGAAAATGCGAC-3') 와 SiW6R1 (5'-CTTGGATCCTGGAAAGGAGAAATCGCGTGAAAGCAC-3')을 사용하여 PCR을 수행한 결과 *Si-FAD2* 유전자 프로모터 부위(-660 내지 +141)를 획득하였고, 이를 *Hind*III와 *Bam*HI으로 절단한 뒤 상용 binary 벡터인 pBI101 벡터(Cat. # 6017-1, Clonetech, 미국)의 *Hind*III와 *Bam*HI 제한효소 부위에 삽입하여 pBin*SiFAD2*-GUS라는 binary vector를 제조하였다. 도 4a는 pBin*SiFAD2*-GUS binary vector를 나타내는 모식도로서, 여기서 GUS는 β -Glucuronidase를 코딩하는 리포터 유전자(발현을 원하는 외래유전자로 치환가능)이고, NPTII는 Neomycin Phosphotransferase II를

코딩하는 kanamycin 저항성 마커 유전자이고, Nos-pro와 Nos-ter는 NPTII의 식물체 발현 프로모터와 터미네이터이다.

55> 상기와 같이 제조된 pBinSiFAD2-GUS의 *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (Suh et al., 2002, Molecules and Cells)내로의 도입은 Freeze-thaw 방법(An, G. 1987, Methods in Enzymology)에 근거하여 수행하였다. *Agrobacteria*를 O.D.=0.5가 되도록 YEP 배지에서 혼탁 배양한 후, 20 mM CaCl₂ 용액에 혼탁한 다음, pBinSiFAD2-GUS binary vector와 혼합하여 액체질소에 1분간 방치한 후, 37 °C에서 2분간 배양함으로써 *Agrobacterium tumefaciens* C58C1내로 도입하였다. 도 4b는 도 4a에서 보여지는 pBinSiFAD2-GUS binary 벡터와 CaMV35S 프로모터가 함유된 binary 벡터 pBI121 (Cat. # 6018-1, Clontech, 미국)를 *Agrobacterium tumefaciens* C58C1로 각각 도입한 후, 형질전환된 *Agrobacteria*를 binary vector내에 존재하는 유전자 특이적 primers를 이용하여 PCR을 수행한 결과를 나타낸 것이다. M은 DNA size 마커이고; N은 pBI121 binary 벡터를 가진 *Agrobacteria*와 SiW6F1과 SiW6R1을 사용하여 얻은 PCR 산물(negative control)이고; P는 pBin

SiFAD2-GUS binary 벡터를 가진 대장균과 *SiW6F1*과 *SiW6R1*을 사용하여 얻은 PCR 산물 (positive control)이고; SS는 pBin*SiFAD2-GUS* binary 벡터를 가진 *Agrobacterium*와 *SiW6F1*과 *SiW6R1*을 사용하여 얻은 PCR 산물이고; SN는 pBin*SiFAD2-GUS* binary 벡터를 가진 *Agrobacterium* 와 npt II 유전자 (kanamycin 저항성 마커 유전자)내의 primers (Forward primer : 5'-GAGGCTATTGGCTATGACTG-3' 와 reverse primer: 5'-ATCGGGAGCGCGATAACCGTA-3')를 사용하여 얻은 PCR 산물이고; V는 pBI121 binary vector를 가진 *Agrobacterium*와 nptII 유전자내의 primers(상동)를 사용하여 얻은 PCR 산물로써 nptII primer를 사용한 경우 약 700 bp의 PCR 산물은 얻을 수 있었고, *SiW6F1*과 *SiW6R1*등의 유전자 primer를 이용한 경우 약 750bp의 PCR산물을 얻을 수 있었다. 도 4b로부터 pBin*SiFAD2-GUS*와 pBI121 binary vector가 *Agrobacterium* 내로 도입되었음을 확인하였다.

- 56> 애기장대 (*Arabidopsis thaliana* cv. columbia) 꽃 조직에 pBin*SiFAD2-GUS* 혹은 pBI121 binary vector가 각각 도입된 *Agrobacterium*를 2일동안 28 °C에서 진탕 배양한 후, floral dip 방법 (Clough 와 Bent, 1998, The Plant Journal)에 근거하여 애기장대의 개화직전 암술머리에 접종함으로써 애기장대를 형질전환시켰다. 도 4c는 도 4b의 pBin*SiFAD2-GUS* 혹은 pBI121 binary vector를 가진 *Agrobacterium*를 애기장대 (*Arabidopsis thaliana*) 식물체의 꽃 조직에 접종함으로써 애기장대를 형질전환시킨 것을 나타낸 것이다. a는 pBI121 binary vector를 가진 *Agrobacterium*에 의해 형질전환된 애기장대이고; b는 pBin*SiFAD2-GUS* binary vector를 가진 *Agrobacterium*에 의해 형질전환된 애기장대이다.
- 57> 형질전환한 결과 kanamycin (30 µg/ml)에 저항능을 가진 형질전환 식물체를 선별하여 식물체의 각 조직으로부터

Si-FAD2 유전자의 프로모터에 의해 발현이 조절되는 외래 도입 유전자, β -glucuronidase (GUS) 활성을 조직 화학적 염색 방법 및 효소학적 방법을 이용하여 조사하였다. 도 5는 *Si*-FAD2 유전자 프로모터 하에 GUS가 함유된 binary 벡터를 가진 *Agrobacterium*를 이용하여 애기장대를 형질전환 시킨 다음, 형질전환 식물체의 각 조직별 GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법으로 조사한 것이다. (A)는 형질전환 되지 않은 애기장대이고; (B)는 pBI121을 함유한 예 의해 형질전환된 애기장대이고; (C)는 pBin*Si*FAD2-GUS binary vector를 가진 예 의해 형질전환된 애기장대이다.

- :58> 도 6a는 *Si*-FAD2 유전자의 프로모터 하에 GUS 유전자가 함유된 binary vector를 가진 *Agrobacterium*에 의해 형질전환된 애기장대의 각 조직별 GUS 활성을 조사하여 가장 낮은 활성도를 1%라 정하여 그들의 상대적인 효소 활성도를 나타낸 것이다. 종자는 개화 후 발달 단계별 (종자1; 개화 후 5 - 7일, 종자2; 개화 후 10 - 15일, 종자3; 개화 후 20 - 25일)로 채취하여 시료로 사용하였다. 도 6b는 pBin*Si*FAD2-GUS binary 벡터 혹은 pBI121을 가진 *Agrobacterium*에 의해 형질전환된 애기장대들의 종자 발달 단계별 GUS 활성을 조사한 다음, 가장 낮은 활성도를 1%라 정하여 그들의 상대적인 효소 활성도를 비교하여 나타낸 것이다. 도 5 및 도 6a, b로부터 참깨 유래 *Si*-FAD2 유전자의 프로모터하의 GUS는 애기장대 종자 특이적으로 발현하며 특히 개화 후 10일에서 25일 사이의 발달 종자에서 가장 강한 발현을 나타냄을 확인하였다. 특히, 종자 발달 2기와 3기에서 그 발현양은 CaMV35S 프로모터에 비해 5배 적게 발현됨을 확인하였다. 이는 참깨 유래 *Si*-FAD2 유전자의 프로모터가 종자 특이적이며, 특히 종자 발달 단계 특이적으로 외래 유전자를 발현시킬 수 있는 프로모터임을 제시한다.
- :59> (실시예 5) 참깨 종자 내 *Si*-FAD2 유전자 프로모터의 활성 분석

- 60> 모델 식물체인 애기장대 뿐만 아니라 참깨 종자 내에서 *Si-FAD2* 유전자의 프로모터의 활성을 조사하기 위하여 클로닝된 *Si-FAD2* 유전자의 프로모터 및 GUS reporter 유전자를 함유하는 transient expression vector (*pSiFAD2-GUS*)를 제조하였다. 우선 실시예 4에서 획득한 *Hin* dIII 와 *Bam*HI 제한 효소 부위를 갖는 *Si-FAD2* genomic 유전자의 프로모터 부위(-660 내지 +141)를 *Hind*III와 *Bam*HI으로 절단한 뒤, 외래 유전자 발현을 일시적으로 볼 수 있는 transient expression vector인 pBI221 (Cat. # 6019-1, Clonetech, 미국)에서 CaMV35S 프로모터를 *Hind*III 와 *Bam*HI 제한효소 부위를 이용하여 제거한 다음, 동일한 위치에 삽입하였다. 이로써 *Si-FAD2* genomic 유전자의 프로모터가 삽입된 transient expression vector, *pSiFAD2-GUS*를 제조하였다. 도 7a는 상기와 같이 제조된 transient expression vector(*pSiFAD2-GUS*)를 나타내는 모식도로서, 여기서 GUS는 β -Glucuronidase를 코딩하는 리포터 유전자(발현을 원하는 외래유전자로 치환가능)이고, Nos-ter는 nopaline synthase 유전자의 유전자 발현 터미네이터이다.
- 61> *pSiFAD2-GUS* transient expression vector는 plasmid midi kit (Qiagen, 미국)을 이용하여 plasmid를 추출한 다음, 1.6 μ m gold particle (Bio-rad, 미국)로 코팅하였다. 한번에 도입되는 DNA와 gold particle의 비율은 2ug DNA/500ug gold particle이었으며, particle bombardment (PDS1000/He gun, Bio-rad) 조건은 1100psi He gas 압력을 사용하였고 27°C에서 18시간 incubation 하였다. *Si-FAD2* 유전자의 프로모터에 의해 발현이 조절되는 외래 도입 유전자, GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법을 이용하여 조사하였다. 도 7b는 도 7a에서 보여지는 벡터를 참깨의 발달하는 종자에 particle bombardment 방법에 의거하여 도입한 다음, 종자에서 GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법으로 조사한 것이다. a는 프로모터가 없는 pBI221 vector이고; b는 CaMV35S 프로모터가 있는 pBI221 vector이고; c는 *Si-FAD2* 유전자의 프로모터가 있

는 pSiFAD2-GUS vector이다. 도 7b를 통해 참깨 유래 Si-FAD2 유전자의 프로모터는 참깨 종자에서도 정상적으로 외래 유전자를 발현시킬 수 있는 프로모터임을 확인하였다.

- 52> (실시예 6) Si-FAD2 유전자 프로모터 안에 종자 특이적 발현에 필수적인 프로모터 활성 단편 및 그의 게놈 유전자에 존재하는 intron을 포함하는 binary 벡터 제조
- 63> 본 발명의 참깨 Si-FAD2 유전자 프로모터 안에서 종자 특이적 발현에 관여하는 프로모터 활성 단편을 분석하고, Si-FAD2 유전자 안에 존재하는 intron이 형질전환 식물체에서 외래 유전자 발현에 미치는 영향을 분석하기 위하여, 우선 기존에 특히 출원된 Si-FAD2 게놈 유전자의 프로모터 및 유전자 서열을 이용하여 하기 표 1과 같이 HindIII (AAGCTT)와 BamHI (GGATCC) 제한 효소 부위를 포함하는 유전자 특이적 primers를 제조하였다.

64> [표 1]

65>

	Primer name	Sequence	Tm
Forward primer	SiW6F1	5'-CCG AAG CTT CAT ATG TGA AAT GTA ATG GAA AAT GCG AC-3'	72 °C
	SiW6F2	5'-CCG AAG CTT GGG ACAT GTC CAC ATT ATG TGC-3'	67 °C
	SiW6F3	5'-CCG AAG CTT GTC CTA ACC AGG TTT GAA CAA CC-3'	67 °C
	SiW6F4	5'-CCG AAG CTT GGA ATG TGC ACA CTC CAT GTC-3'	67 °C
	SiW6F5	5'-CCG AAG CTT GGG CCC CTC CTC AGA CAG G-3'	71 °C
Reverse primer	SiW6R1	5'-CTT GGA TCC TTG GAA GGA GAA ATC GCG TGA AAGCAC-3'	75 °C
	SiW6R3	5'-CAA GGA TCC GTC AAG CCG CCC CCA ATT TAC-3'	68 °C

- 66> 다음, 참깨의 게놈 DNA를 주형으로 상기 primers를 이용하여 원래의 크기 및 5' 말단부 터 일부분이 제거된 프로모터 부위를 중합효소 연쇄 반응 (Polymerase Chain Reaction) 방법으로 확보하였다. 확보된 PCR 생성물을

HindIII 와 *BamHI* 으로 절단한 뒤, β -glucuronidase (이하 'GUS'라 약칭함) 유전자를 함유하는 통상의 binary vector인 pBI101 (Cat.# 6017-1, Clonetech, 미국)의 *HindIII* 와 *BamHI* 제한효소 부위에 삽입하여 본 발명의 바이너리 벡터(pSiW6-P2.4, pSiW6-F1, pSiW6-F2, pSiW6-F3, pSiW6-F4, pSiW6-F5)를 제조하였다 (도 8a). 도 8a는 함께 유래 microsomal oleic acid desaturase 유전자의 프로모터와 유전자 안에 존재하는 intron을 포함하는 binary vector (pSiW6-P2.4)를 나타내는 모식도로서, 여기서 GUS는 β -glucuronidase를 코딩하는 리포터 유전자 (발현을 원하는 외래유전자로 치환가능)이고, NPTII는 Neomycin Phosphotransferase II를 코딩하는 kanamycin 저항성 마커 유전자이고, Nos-pro와 Nos-ter는 NPTII의 식물체 발현 프로모터와 터미네이터이다. 그리고 GUS 리포터 유전자는 삽입된 프로모터와 Nos 터미네이터 (Nos-ter)에 의해 식물체에서 발현된다.

- 67> 상기 제조된 각각의 binary vector들을 대장균에 도입한 다음, alkaline lysis 방법 (Sambrook et al., 2001)에 의거하여 플라스미드를 추출하여 제한효소 *HindIII* 와 *BamHI*를 이용하여 절단한 다음 0.7% agarose 젤에서 전기영동하였다(도 8b). 도 8b는 6종류의 binary 벡터들을 제한효소 *HindIII* 와 *BamHI*를 이용하여 절단한 다음, 0.7% agarose 젤에서 전기영동한 것을 나타낸 것이다. 여기서, pSiW6-P2.4는 유전자특이적 primers SiW6F1 (-660 bp) 과 SiW6R3 (+1743 bp) 에 의해 증폭된 기존의 프로모터부위와 그의 유전자 안에 존재하는 intron을 함유하는 binary 벡터이고, pSiW6-F1는 유전자 특이적 primers SiW6F1 (-660 bp) 과 SiW6R1 (+141 bp)에 의해 증폭된 프로모터 부위를 함유한 binary 벡터 (이는 기존에 출원된 pBinSiFAD2-GUS 와 동일한 binary 벡터임)이고, pSiW6-F2는 유전자특이적 primers SiW6F2 (-547 bp) 와 SiW6R1(+141 bp)에 의해 증폭된 프로모터 부위를 함유한 binary 벡터이고, pSiW6-F3는 유전자특이적 primers SiW6F3 (-346 bp) 과 SiW6R1 (+141 bp)에 의해 증폭된 프로모터부위를 함유한

binary 벡터이고, pSiW6-F4는 유전자 특이적 primers SiW6F4 (-179 bp) 와 SiW6R1 (+141 bp)에 의해 증폭된 프로모터 부위를 함유한 binary 벡터이고, pSiW6-F5는 유전자 특이적 primers SiW6F5 (-52 bp) 와 SiW6R1 (+141 bp)에 의해 증폭된 프로모터 부위를 함유한 binary 벡터이다.

<68> (실시예 7) 제조된 binary 벡터를 이용해서 *Arabidopsis* 식물체의 형질전환

<69> 상기 실시예 6에서 제조된 6종류의 binary 벡터들 (pSiW6-P2.4, pSiW6-F1, pSiW6-F2, pSiW6-F3, pSiW6-F4, pSiW6-F5)과 pBI121 binary 벡터 (Cat.# 6018-1, Clonetech, 미국)를 *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 (Suh et al., 2002, Molecules and Cells)내로의 도입은 Freeze-thaw 방법(An, G. 1987, Mothods in Enzymology)에 근거하여 수행하였다. *Agrobacteria* 를 O.D.=0.5가 되도록 YEP 배지에서 혼탁 배양한 후, 20 mM CaCl₂ 용액에 혼탁한 다음, 7종류의 binary 벡터와 각각 혼합하여 액체질소에 1분간 방치한 후, 37 °C에서 2분간 배양함으로써 *Agrobacterium tumefaciens* C58C1내로 도입하였다. 각각의 형질전환된 *Agrobacteria*는 2일동안 28 °C에서 진탕 배양한 후, floral dip 방법 (Clough 와 Bent, 1998, The Plant Journal)에 근거하여 애기장대 (*Arabidopsis thaliana* cv. columbia)의 개화직전 암술머리에 접종함으로써 애기장대를 형질전환 시켰다.

<70> 도 9는 도 8b의 6종류의 binary 벡터들과 pBI121 binary vector를 가진 *Agrobacteria*에 의해 형질전환된 애기장대들의 사진이다.

<71> (실시예 8) 형질전환된 애기장대의 조직 화학적 염색 및 효소학적 분석

<72> 상기 실시예 7에서 제조된 7종류의 애기장대 형질전환체로 부터 종자를 수확한 다음, kanamycin (30 µg/ml)을 함유하는 MS 배지에 도말하여 저항능을 가진 형질전환 식물체를 선별

하였다. 선별된 형질전환 식물체의 각 조직으로부터 GUS 활성을 조직 화학적 염색 방법 및 효소학적 방법을 이용하여 조사하였다. 각 형질전환 식물체의 조직을 염색하기 위하여, 식물체의 조직은 1mM X-glu (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -glucuronide), 100 mM sodium phosphate (pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.5 mM potassium ferricyanide, 0.5 mM potassium ferrocyanide, 그리고 0.1% Triton X-100을 함유하는 용액에 담구어 37 °C에서 12 시간 동안 반응시킨 다음, 용액을 제거한 후 100% 에탄올을 부가함으로써 조직에 존재하는 클로로필을 제거했다. 또한 GUS의 활성을 정량적으로 조사하기 위하여, Jerrerson et al (EMBO J. 6: 3901-3907, 1987)의 방법에 의거하여 형질전환 식물체의 각 조직을 50 mM sodium phosphate (pH 7.0), 10 mM EDTA, 0.1% Triton X-100, 0.1% sodium lauroylsarcosine, 그리고 10 mM β -mercaptoethanol을 함유하는 용액에서 마쇄한 다음, 12,000g에서 원심분리하여 상등액을 취했다. 획득된 상등액은 1 mM MUG (4-methylumbelliferyl glucuronide)와 섞어 37 °C에서 반응시킨 다음, 0.2 M Na₂CO₃를 넣어 반응을 종료시켰다. 반응이 종료된 반응액은 fluorometer를 이용하여 365 nm 와 455 nm 파장에서 값을 측정한 다음, 측정된 값은 MUG 표준용액을 이용하여 만든 표준곡선과 비교함으로써 GUS 활성을 계산하였다.

73> 도 10은 상기 7종류의 형질전환된 애기장대의 발달 종자 (종자1; 개화 후 5 ~ 7일, 종자2; 개화 후 10 ~ 15일, 종자3; 개화 후 20 ~ 25일), 종자를 둘러싼 꼬투리, 그리고 종자로부터 나온 유식물에서 GUS 활성을 조직 화학적 염색한 것이다. CaMV35S는 pBI121 binary 벡터에 의해 형질전환된 애기장대이고, SiW6P2.4는 pSiW6-P2.4, SiW6F1는 pSiW6-F1, SiW6F2는 pSiW6-F2, SiW6F3는 pSiW6-F3, SiW6F4는 pSiW6-F4, 그리고 SiW6F5는 pSiW6-F5에 의해 형질전환된 애기장대이다. 도 10의 결과에 의거하면, microsomal oleic acid desaturase 유전자의 프로모터는 5' 말단 부위에서부터 점차적으로 약 200-150 bp 정도 삭제된 프로모터 부위를 이용하

여도 종자 특이적으로 외래 유전자의 발현을 유도하였다. 뿐만 아니라, microsomal oleic acid desaturase 유전자의 프로모터 (-660/+141)에 이 유전자의 5' UTR (untranslated region)에 존재하는 intron을 삽입하였을 경우 (SiW6P2.4, -660/+1743), 발달하는 종자뿐만 아니라 종자를 둘러싼 꼬투리 및 종자를 발아시킨 유식물체의 자엽에서 외래 유전자의 발현을 확인하였다.

:74> 도 11a는 도 10에서 획득된 7종류의 형질전환 애기장대에서 발달하는 종자 (종자1; 개화 후 5 - 7일, 종자2; 개화 후 10-15일, 종자3; 개화 후 20-25일) 및 종자를 둘러싼 꼬투리에서 GUS 효소의 활성을 조사한 것이다. 보여지는 GUS 활성도는 각 construct별로 얻어진 10개 형질전환체 (T_1 식물체)를 분석하여 얻어진 값이다. 도 11a에서 보면, microsomal oleic acid desaturase 유전자의 프로모터는 5' 말단 부위에서부터 점차적으로 약 200-150 bp 정도 삭제된 프로모터 부위를 이용하여 형질전환 시킨 식물체를 분석한 결과, SiW6F1 (-660/+141), SiW6F2 (-547/+141), SiW6F3 (-346/+141) 및 SiW6F4 (-179/+141)를 사용하였을 때, SiW6F5 (-52/+141)의 경우보다 개화 후 10 - 25일 사이의 발달하는 종자에서 약 4 - 10배 이상의 GUS 활성을 확인하였다. 이로 부터 microsomal oleic acid desaturase 유전자 프로모터에서 -179에서 -53 부위의 염기서열이 종자 특이적 발현을 유도하는 핵심 부위임을 알 수 있다. 또한, intron이 포함된 SiW6P2.4 construct (-660/+1743)를 사용한 경우, intron을 포함하지 않은 SiW6F1 (-660/+141)를 사용한 경우보다 개화 후 10 - 25일 사이의 발달하는 종자에서 약 40배 이상, 종자를 둘러싼 꼬투리에서 약 10배 이상의 GUS 활성도가 증가됨을 확인하였다. 이로 부터 microsomal oleic acid desaturase 유전자의 프로모터를 자신의 5' UTR에 존재하는 intron과 함께 사용하였을 경우, 외래 유전자의 발현을 발달하는 종자 및 종자를 둘러싼 꼬투리에서 크게 증가시킬 수 있음을 알 수 있다.

75> 도 11b는 도 10에서 획득된 형질전환 애기장대로부터 수확된 종자(T_2)를 항생제 (kanamycin, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 함유하는 배지에 도말하여 항생제에 저항성을 갖는 형질전환체를 선별한 다음, 발아 후 7일째 되는 유식물체에서 GUS 효소의 활성을 조사한 것이다. 보여지는 GUS 활성도는 각 construct별로 얻어진 5개 형질전환체 (T_2 식물체)를 분석하여 얻어진 값이다. 어떤 유식물체에서는 microsomal oleic acid desaturase 유전자 프로모터만을 사용한 construct들 (SiW6F1, SiW6F2, SiW6F3, SiW6F4 및 SiW6F5)에서는 거의 GUS의 활성이 조사되지 않았으나, microsomal oleic acid desaturase 유전자 프로모터에 intron이 도입된 construct (SiW6P2.4)에서는 intron이 도입되지 않은 construct (SiW6F1)에 비해 유식물체의 자엽에서 GUS의 활성이 약 30배 이상 증가됨을 확인하였다. 이러한 결과로 부터 기존에 출원된 microsomal oleic acid desaturase 유전자의 프로모터는 외래 도입 유전자를 종자 발달 특이적으로 발현시켰으나, 이 프로모터와 그의 유전자 안에 존재하는 intron을 함께 사용하였을 경우, 종자뿐만 아니라 종자 의 꼬투리와 발아한 유식물의 자엽 특이적으로 외래 도입 유전자를 발현시킬 수 있음을 알 수 있다.

【발명의 효과】

76> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에서는 참깨에서 유래된 microsomal oleic acid desaturase (*Si-FAD2*) 게놈 유전자 및 현재까지 밝혀지지 않은 *Si-FAD2* 유전자 프로모터의 염기서열을 제공하였다. 이러한 *Si-FAD2* 유전자 프로모터를 이용하여 외래 유전자를 식물체에서 발현시킨 결과, 식물체의 종자 발달 단계 특이적으로 발현을 유도하는 신규 프로모터임을 확인하였다. 따라서, 본 발명은 외래 유전자를 형질전환 식물체에서 발현시키는 방법을 제공함으로써, 식물체의 종자 특이적으로 유용물질을 생산하거나, 기존의 종자 내 생산 물질을 기능적으로 변형시키고자 하는 형질전환 식물체 개발에 유용하게 이용될 수 있다. 또한, 본 발명은 발

1020030024776

출력 일자: 2003/11/11

현증가활성의 인트론 부위를 프로모터와 함께 사용함으로써, 도입된 유전자의 발현을 종자에서 적어도 40배 이상 증가시킬 수 있으므로, 본 발명은 식물체의 종자에서 외래 도입 유전자를 대량 발현시키고자 하는 형질전환 식물체개발에 이용될 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

서열번호 3의 -179 내지 -53의 활성 단편을 포함하는 식물체의 종자 특이적 발현 프로모터.

【청구항 2】

제 1항에 있어서, 서열번호 3의 염기서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 식물체의 종자 특이적 발현 프로모터.

【청구항 3】

제 1항의 프로모터를 함유하는 식물체의 종자 특이적 발현 벡터.

【청구항 4】

제 3항에 있어서, 서열번호 1의 149 내지 1722의 발현증가활성 인트론을 포함하는 것을 특징으로 하는 식물체의 종자 특이적 발현 벡터.

【청구항 5】

제 3항에 있어서, 상기 프로모터가 바이너리(binary) 벡터의 의해 유전자 앞에 삽입된 것을 특징으로 하는 식물체의 종자 특이적 발현 벡터.

【청구항 6】

제 5항에 있어서, 도 4a에 도시된 pBinSiFAD2-GUS인 것을 특징으로 하는 식물체의 종자 특이적 발현 벡터.

【청구항 7】

제 5항에 있어서, 도 8a에 도시된 pSiW6-P2.4인 것을 특징으로 하는 식물체의 종자 특이적 발현 벡터.

【청구항 8】

제 3항에 있어서, 상기 프로모터가 트랜전트(transient) 발현 벡터의 외래 유전자 앞에 삽입된 것을 특징으로 하는 식물체의 종자 특이적 발현 벡터.

【청구항 9】

제 8항에 있어서, 도 7a에 도시된 pSiFAD2-GUS인 것을 특징으로 하는 식물체의 종자 특이적 발현 벡터.

【청구항 10】

제 3항 내지 제 9항 중 어느 한 항의 종자 특이적 발현 벡터로 형질전환된 식물체.

【청구항 11】

제 3항 내지 제 9항 중 어느 한 항의 종자 특이적 발현 벡터를 식물체에 도입하여 외래 유전자를 형질전환 식물체에서 발현시키는 방법.

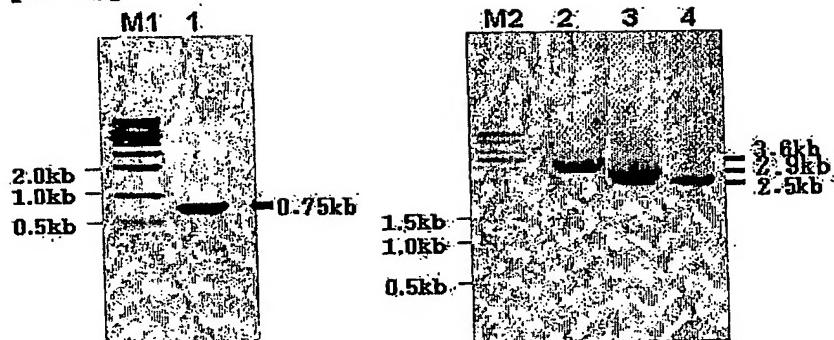
【동면】

[卷 1]

【도 2a】

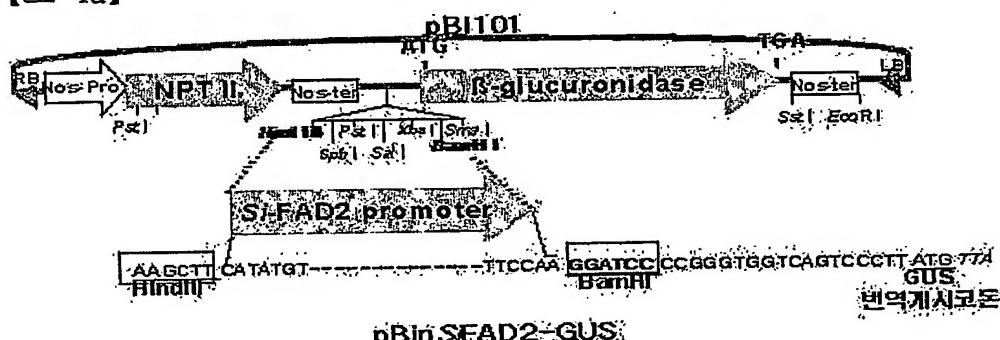


【도 2b】

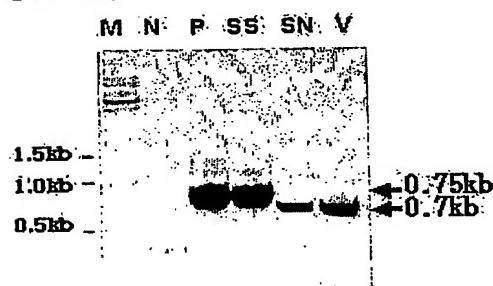


[卷 3]

[도 4a]



[E 4b]



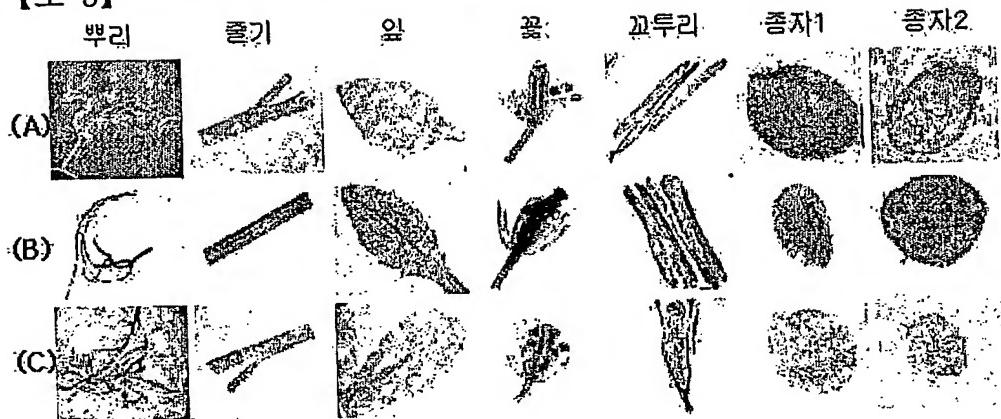
I020030024776

출력 일자: 2003/11/11

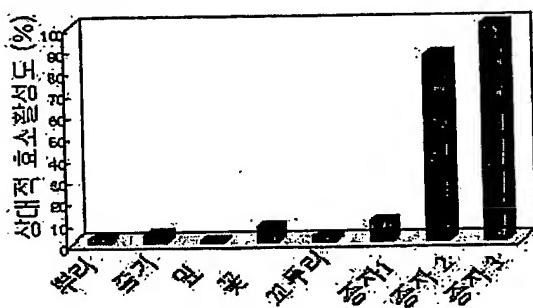
【도 4c】



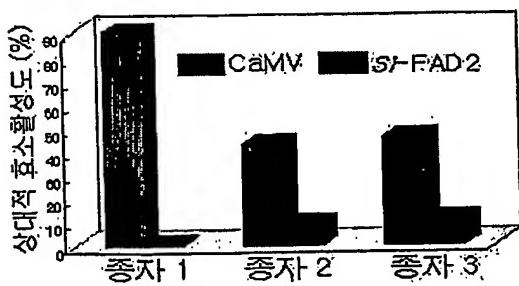
【도 5】



【도 6a】



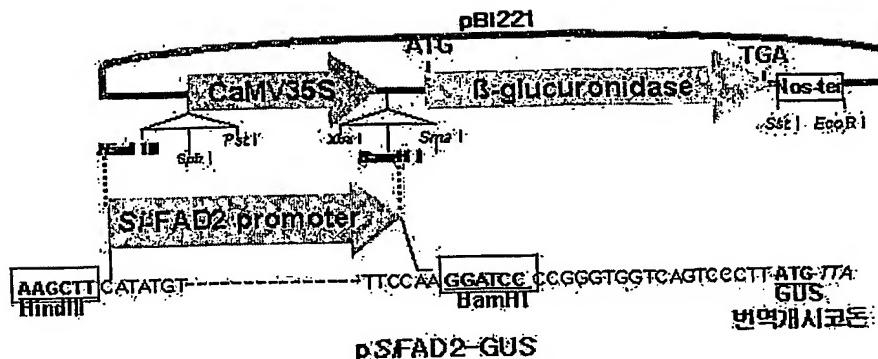
【도 6b】



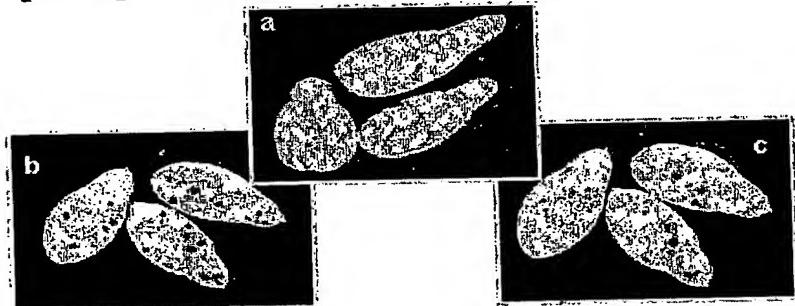
I020030024776

출력 일자: 2003/11/11

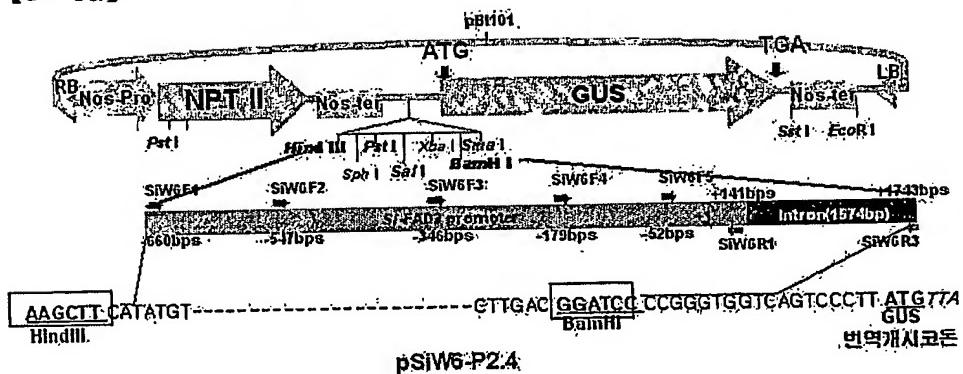
【도 7a】



【도 7b】



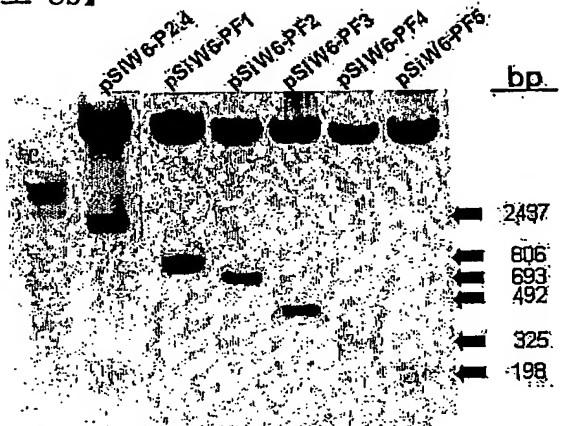
【도 8a】



1020030024776

출력 일자: 2003/11/11

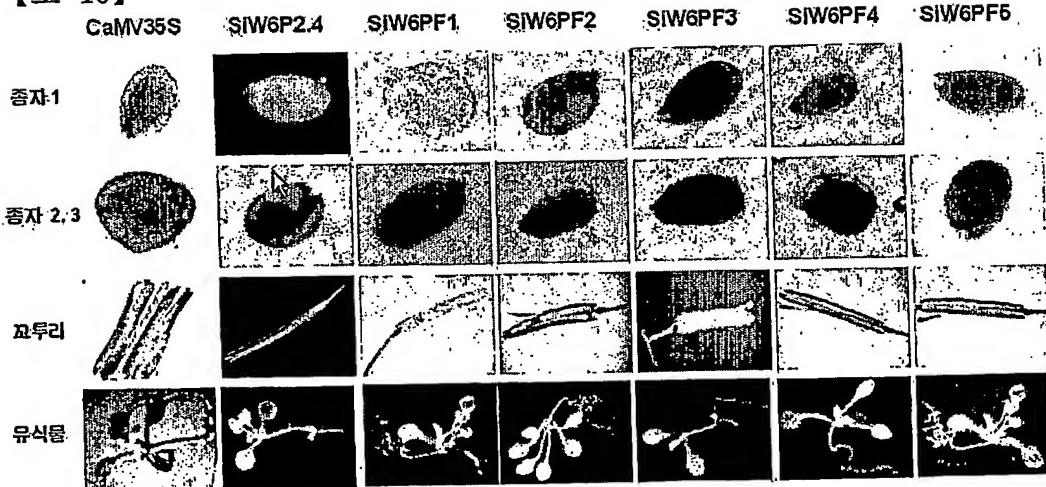
【도 8b】



【도 9】



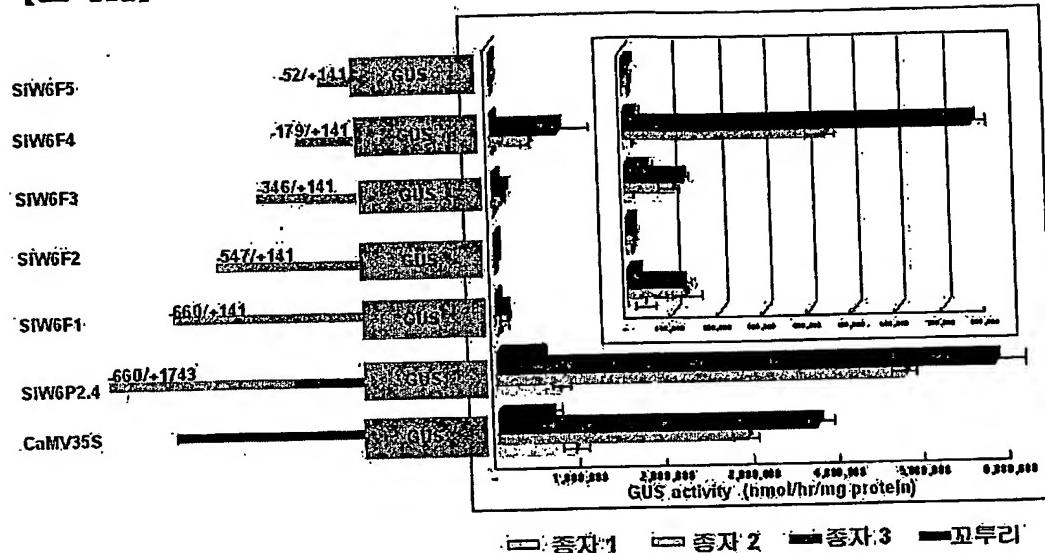
【도 10】



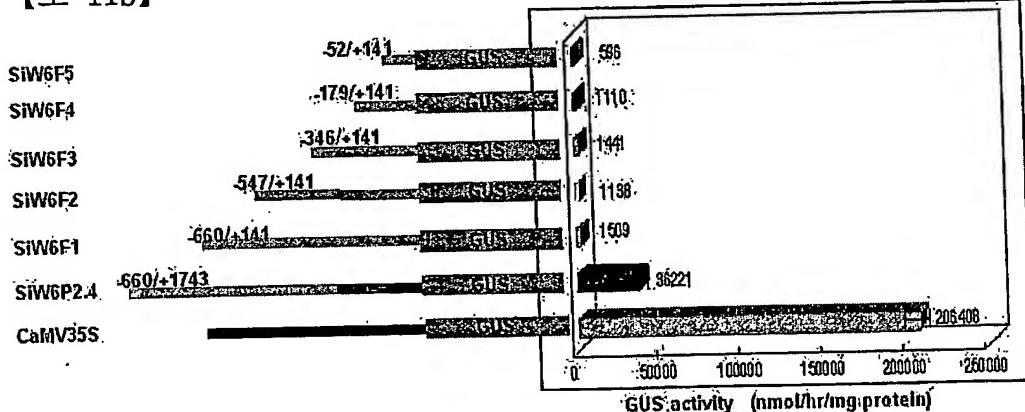
1020030024776

출력 일자: 2003/11/11

【도 11a】



【도 11b】



【도 12】

179 GGAATGTGCACACTCCATGTGGGCCAATGAGCGGATGACACGTGGCGGG
CAACTTACCTCGTTACGTTGAGGCATGCATGAAAGGGGGATCTCTGAGGTGGA
GGGGTGGCGCGGGGGTTGGGGGG -53

【서열목록】

<110> KOREA CHUNGANG EDUCATIONAL FOUNDATION <120> Plant seed-specific
expression promoter derived from sesame and seed-specific expression vector
comprising the promoter <130> Gn14288 <150> KR 10-2002-0069589 <151>
2002-11-11 <160> 3 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 3102 <212> DNA

<213>	Sesamum indicum	<220> <221>	5'UTR	<222>	(1)..(1746)	<220> <221>
intron	<222>	(149)..(1722)	<220> <221>	3'UTR	<222>	(2899)..(3102)
1	aacgccactc	aatatttca	ccaccaccac	caccagaaca	ttcagaaaca	agaaaataaac
	acacacacac	tataaaacag	ttcttgcgaa	agaaggaaag	cgcttccgca	gaagtgcgtt
	cacgcgattt	ctccttccaa	gttttcaggt	aacgtcccc	ctttctctt	ctcttctatt
	ctctttctc	ataattcatg	atcaatctt	gagtatttg	gtgtttgtt	gtctcaagaa
	aaccgcattt	ttatTTctt	gcaatggtgt	ctttatttcc	tgtcgTTTT	ttcagctatt
	aatgttcttt	tgtatgtatg	gaggTTtaat	cgtatgttct	tgagctgcat	tacctgatga
	ttcatggatc	tgaggaatgt	atgcgatttt	ttatTTTgt	tttattttt	ggtgggctt
	cccaagaaga	atctatttgg	ggttattctt	gtgtggTTt	gtgcaaatct	ttggatttt
	cgcagtattt	gtgtctggac	cacatgattt	tgtcatttat	atttggattt	tgtctttatc
	tttgtatgca	tgtgggatgc	aggaagaaaa	aactgtggta	aatgtcttt	aagagattga
	tttagcatat	atacaaggtt	gcctgggctt	cagTTTgtat	gattttgtatg	tacattgtgg
	agatttgtat	ggttgcattgt	ggctcaaatc	ttcttgcata	atttggatttt	tgtccaaaaaa
	atttgggatt	tttccacttt	tattgaacag	tagatcttt	cctgtttcaa	cccaaaggtt
	atttcggttt	gaagttttac	atcatagata	taatttagtaa	taaatttcgg	ttaggtccgt
	aaagaatcat	taattacatc	aattaatatt	gttaatgtta	caaaaagagg	gaatttatgg
	tgatatctat	gaagccatgc	tatgcctggc	tggaattccg	tcgatgaaaa	agacagattc
	cggtgtgtgg	tagatttcac	tgttagtgaa	taccccactt	caaagaacgg	tgctgattca
	actgctctag	tcctcaggat	tttagtacta	cttggTTgt	gtttggaaaca	catggctgaa
	aataaatgtc	tgctttcga	ccttggcgct	tagagaattt	actaccacat	ctcattttta

I020030024776

출력 일자: 2003/11/11

gcatccaaac gatgatttct gctgtcagaa tgaatgaatt gactaagagc aactcggtta	1200
tttgagattg aattggtgt ttgtgattgt tggatttg ttttgcgt tatgatctt	1260
tgaggattc gccataacaat gctgatacta gtcgttgta tttccggta tatgtattt	1320
tgacgtatcg ttctgttagtt tggttaactaa tagaatgcat gtgggtgtaa ctaatagaat	1380
gcatgttgta gtaacaaatg cacattgtag attctcgtagg attttcggg tgttcggtac	1440
cagcacatttgcgattctgg tatgattttt gtcgtgtca ttgttttagtt gcctttcttg	1500
gctgccacta tttcattttagg aatgttaggac gttgttcgtat gcaaaaagaac ttttgcgcac	1560
tagaatgcag gtggcaatct ggaatctcctt attatgggag gaactactgt aattgggagg	1620
ttttgattca gacaatcttag taacagtcta gaagctactt tgcctttaaa tctcaatgac	1680
cttaaacgcc atgatggaga catttgaatc catgtttgc aggtaaattt gggcggctt	1740
gacaaaatgg gagccggagg acgcatgtct gatccaacaa cgaaagacga acaaaaagaag	1800
aacccttcc aacgggtgcc ttacgcaaag cctccattca cactcggtga catcaagaag	1860
gccattccac cacactgctt cgagagatcc gtcagccgtt cgttctccata tgtcggttac	1920
gatctcgta ttgtttcct tctctactac attgcgactt cttaacttcca tctgctgccat	1980
tccccatact gctacctagc ttggcccatt tactgggctg tacaaggctg cgtttgcacc	2040
ggaatctggg tcattgccc aatgtggc caccatgcat tcagcgattt ccagtggctt	2100
gacgacacag ttggcctcat cctgcactct gcccgtcg tgccctattt ctcatggaaa	2160
tacagccacc gcccacca ctccaaacact ggatcccttg agcgtgacga agtcttcgtc	2220
ccaaagccaa aatccagagt ctcgtggtac tccaaatact tgaacaatcc acttggcaga	2280
gtcatcacac ttgtggttac tcttactctc ggttggcctc tatacttgct gtttaatgtc	2340
tctggcaggc cttacaaccg ttttgcgtac cactttgacc catatggtcc aatatataat	2400

1020030024776

출력 일자: 2003/11/11

Cys	Thr	Gly	Ile	Trp	Val	Ile	Ala	His	Glu	Cys	Gly	His	His	Ala	Phe	100															
105						110	Ser	Asp	Tyr	Gln	Trp	Leu	Asp	Asp	Thr	Val	Gly	Leu	Ile	Leu	His										
Ser			115				120								125	Ala	Leu	Leu	Val	Pro	Tyr	Phe									
								Ser	Trp	Lys	Tyr	Ser	His	Arg	Arg	His	130			135		140									
								His	Ser	Asn	Thr	Gly	Ser	Leu	Glu	Arg	Asp	Glu	Val	Phe	Val	Pro	Lys	145							
150					155										160	Pro	Lys	Ser	Arg	Val	Ser	Trp	Tyr	Ser	Lys						
Tyr	Leu	Asn	Asn	Pro	Leu										165					170				175							
								Gly	Arg	Val	Ile	Thr	Leu	Val	Val	Thr	Leu	Gly	Trp	Pro	Leu		180								
185			190					Tyr	Leu	Leu	Phe	Asn	Val	Ser	Gly	Arg	Pro	Tyr	Asn	Arg	Phe	Ala									
Cys		195				200									205	His	Phe	Asp	Pro	Tyr	Gly	Pro									
								Ile	Tyr	Asn	Asp	Arg	Glu	Arg	Leu	Gln	210			215		220									
								Ile	Phe	Ile	Ser	Asp	Ala	Gly	Ile	Ile	Ala	Ala	Val	Cys	Val	Leu	Tyr	225							
230					235										240	Arg	Val	Ala	Leu	Val	Lys	Gly	Leu	Ala	Trp						
Leu	Val	Cys	Val	Tyr	Gly										245					250				255							
								Val	Pro	Leu	Leu	Ile	Val	Asn	Gly	Phe	Leu	Val	Leu	Ile	Thr	Phe	Leu		260						
265					270											270	Gln	His	Thr	His	Pro	Ser	Leu	Pro	His	Tyr	Asp	Ser	Ser	Glu	Trp
Asp		275				280										285	Trp	Leu	Arg	Gly	Ala	Leu	Ala								
Thr	Val	Asp	Arg	Asp	Tyr	Gly	Val	Leu	290							295									300						
								Asn	Lys	Val	Phe	His	Asn	Ile	Thr	Asp	Thr	His	Val	Thr	His	His	Leu		305						
310					315										320	Phe	Ser	Thr	Met	Pro	His	Tyr	His	Ala	Met						
Glu	Ala	Thr	Lys	Ala	Ile										325					330					335						

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.